# PRODUKSI KITOSAN DARI BAHAN BAKU CANGKANG UDANG MENGGUNAKAN METODE KIMIA DAN ENZIMATIS DENGAN ENZIM KITIN DEASETILASE

**Winda Rahmawati[1], Dian Herasari[1], Husniati[2]**

Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung[1]
Baristand Industri Bandar Lampung[2]
email: ewindathestorm@gmail.com

**Abstrak**

Telah dilakukan penelitian mengenai produksi kitosan dari cangkang udang dengan dua metode. Uji metode kimia meliputi deproteinasi, demineralisasi, deasetilasi dan metode enzimatis dengan deasetilasi kimia sebagian diikuti dengan penambahan enzim kitin deasetilase. Karakterisasi kitosan yang dihasilkan meliputi kadar air, kadar abu, kadar nitrogen dan derajat deasetilasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitosan yang dihasilkan dari metode kimia memiliki kadar air, kadar abu, kadar nitrogen dan derajat deasetilasi berturut– turut 7,39%; 2,10%; 7,59% dan 71%. Sedangkan pada deasetilasi enzimatis, hasil analisis derajat deasetilasi kimia sebagian menggunakan *spektrofotometer fourier transform infrared* (FTIR) menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi 46,68 %, diikuti dengan penambahan enzim CDA (Kitin Deasetilase) menghasilkan kitosan dengan derajat deasetilasi 75,91%.

Kata Kunci: derajat deasetilasi, kitosan, kitin deasetilase.

## 1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara maritim yang kaya akan potensi perikanan seperti udang. Pemanfaatan udang untuk keperluan konsumsi menghasilkan limbah dalam jumlah besar yang belum dimanfaatkan secara komersial.

Sekitar 35% dari cangkang kering udang mengandung kitin. Dari kitin udang dapat dihasilkan sekitar 80% kitosan (No dan Meyer, 1997). Kitin adalah salah satu polisakarida yang melimpah di bumi selain selulosa dan pati, kitin merupakan polimer dari N-asetilglukosamin yang terikat melalui ikatan β-(1,4) (Tsigos dan Bouriotis, 1995). Turunan kitin yang memiliki tingkat N-terasetilasi lebih rendah disebut kitosan. Kitosan yang disebut juga dengan β-1,4-2-amino-2-dioksi-D-glukosa diperoleh dari kitin melalui proses deasetilasi menggunakan basa kuat berkonsentrasi tinggi (No and

Meyer, 1997). Kitosan tidak larut dalam air dan H2SO4, sedikit larut dalam HCl, dan HNO3. Kitosan juga mudah mengalami degradasi dan bersifat polielektrolit (Hirano, 1986). Deasetilasi kitin menjadi kitosan dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu metode kimia dan enzimatis. Metode kimia lebih mudah dan cepat. Sedangkan pada metode enzimatik digunakan enzim spesifik (misal: enzim *kitin deasetilase* ). Dalam sebuah penelitian pendahuluan dilakukan isolasi enzim kitin deasetilase dari mikroba *Aspergillus Aculeatus*. Enzim ini bekerja spesifik memotong gugus asetil dari kitin menjadi kitosan, melalui pemutusan ikatan N-asetamido pada kitin dan merubahnya menjadi kitosan (Kafetzopoulos *et al*., 1993).

Berdasarkan uraian diatas, maka dalam penelitian ini akan dilakukan pembuatan kitin dengan metode kimia yang meliputi tahap deproteinasi, demineralisasi dan deasetilasi kitin untuk menghasilkan kitosan. Sedangkan deasetilasi secara enzimatis menggunakan enzim kitin deasetilase, proses deasetilasi enzimatis bersifat selektif dan tidak merusak struktur rantai kitosan, sehingga menghasilkan kitosan dengan karakteristik yang lebih seragam (Tokoyasu *et al*., 1997) Kitosan yang diperoleh kemudian dikarakterisasi menggunakan Fourier Transform Infrared (FTIR) untuk menganalisis gugus fungsinya.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah cangkang udang dari PT. Indokom Samudra Persada, kitin komersial dari PT. Biotech Sukofindo, crude enzim kitin deasetilase dari penelitian pendahuluan mengenai (Isolasi Enzim Kitin Deasetilase Dari Isolat Tanah Humus *Aspergillus Aculeatus* Dan Identifikasi Enzim Tersebut Dalam Produksi Kitosan, Husniati., dkk), asam klorida pekat (HCl), natrium hidroksida (NaOH), asam asetat ($CH_3COOH$), indikator universal, akuades,

Alat-alat yang digunakan adalah alat gelas, orbital shaker (Memmert), hot plate dan magnetic stirrer (Fisher Scientific), pH meter (HACH), mikropipet (BIOHTIP Oyj), incubator (Memmert), laminar air flow (ESCO), tabung sentrifuga (eppendorf), autoclave (Sturdy), oven (Memmert), kertas saring, statif, penangas air (Stuart Scientific), batang pengaduk, pipet ukur, pipet volum, tanur, corong, , desikator, bola hisap, neraca analitik, penangas minyak, cawan pengabuan, spektrofotometer *fourier transform inframerah* (FTIR) merk varian 2000 Scimitar Series , dan spektrofotometetr *fourier transform inframerah* Shimadzu FTIR -8010PC).

### 2.2 Preosedur Penelitian

#### 2.2.1 Pembuatan Kitosan Dengan Metode Kimia

Proses pembuatan kitosan terdiri atas tiga tahap yaitu deproteinasi merupakan tahap pemisahan protein, demineralisasi yaitu tahap pemisahan mineral. Dan deasetilasi kitin untuk memperoleh kitosan.

#### 2.2.2 Deproteinasi

Sebanyak 40 gram cangkang udang ditempatkan dalam bejana tahan asam basa yang dilengkapi dengan pengaduk, penangas air dan termometer. Kemudian ditambahkan NaOH 3 M sebanyak 400 ml dengan perbandingan 1:10 (b/v) dan dipanaskan selama 60 menit pada suhu 90 $^0$C sambil di aduk konstan.. Endapan yang diperoleh dicuci dengan menggunakan akuades sampai pH netral. Endapan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 $^0$C selama 24 jam. Kitin kasar yang diperoleh berwarna kuning kemerahan.

#### 2.2.3 Demineralisasi

Kitin hasil deproteinasi dimasukkan dalam bejana tahan asam dan basa yang dilengkapi dengan pengaduk, termometer, dan diletakkan dalam penangas air. Kemudian sampel ditambahkan HCl 2M dengan perbandingan 1:7 (b/v) selama 120 menit pada suhu 25-30 $^0$C. Setelah itu, dilakukan penyaringan sehingga

diperoleh filtrat dan endapan. Endapan yang diperoleh dicuci dengan menggunakan akuades sampai pH netral, dan endapan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 $^0$C selama 24 jam, sehingga diperoleh kitin berwarna kuning kemerahan.

**2.2.4 Deasetilasi Kitin**

Kemudian kitin dimasukkan dalam larutan NaOH 20 %, lalu dipanaskan pada suhu 90-100 $^0$C sambil diaduk konstan selama 60 menit. Setelah itu didinginkan selama 3 jam pada suhu ruang dan dilakukan penyaringan untuk memisahkan padatan dan cairannya. Padatannya dicuci dengan akuades sampai pH netral. Selanjutnya padatan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 $^0$C selama 24 jam. Hasil yang diperoleh disebut kitosan. Kitosan yang diperoleh di ukur menggunakan spektrofotometer IR.

**2.3 Pembuatan Kitosan Dengan Metode Enzimatis**

**2.3.1 Deasetilasi Kimia sebagian**

Sebanyak 20 gram tepung kitin komersial direndam dalam larutan NaOH 60% selama 24 jam, kemudian dipanaskan pada suhu 60 $^0$C selama 2 jam. Kemudian kitin yang diperoleh dicuci dengan akuades hingga pH netral, dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 $^0$C selama 24 jam.

**2.3.2 Deasetilasi Enzimatis**

Kitosan hasil deasetilasi kimia sebagian dilarutkan dalam asam asetat 0,1 M. Kemudian dicampurkan enzim CDA sebanyak100 µL dalam 10 ml larutan kitosan 1% kemudian di inkubasi pada suhu 55 $^0$C selama 24 jam.

**2.4 Karakterisasi Kitosan**

**2.4.1 Pengukuran Spektroskopi IR**

Kitosan yang diperoleh dibaca dengan spektrofotometer IR. Kitosan dibuat pelet dengan KBr, kemudian dilakukan *scanning* pada daerah frekuensi antara 4000 cm$^{-1}$ sampai dengan 400 cm$^{-1}$. Spektrum hasil pengukuran yang diperoleh dibandingkan dengan spektrum kitosan standar.

**2.4.2 Kadar Air (AOAC 1999)**

Dilakukan penimbangan terhadap cawan yang hendak dipakai, kemudian dimasukkan sampel cangkang udang sebanyak 1 gram. Sampel lalu dimasukkan dalam oven pada suhu 105$^0$C selama 3 jam sampai diperoleh berat yang tetap, didinginkan dalam desikator lalu ditimbang. Kadar air dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

Perhitungan :

$$\text{Kadar Air} = \frac{b - a}{b} \times 100\%$$

a = berat sampel sesudah dikeringkan
b = berat awal sampel

**2.4.2 Kadar Abu (AOAC 1999)**

Krus porselin untuk pengabuan ditimbang, lalu dibakar dalam tanur pada suhu 600$^0$C selama 3 jam, didinginkan dalam desikator lalu ditimbang. Dimasukkan sampel cangkang udang sebanyak 1 gram, lalu dibakar dalam tanur selama 6 jam pada suhu 600$^0$C sampai diperoleh abu berwarna putih.

Perhitungan:

$$\text{Kadar abu} = \frac{\textit{berat abu(g)}}{\textit{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

**2.4.3 Derajat Deasetilasi**

Derajat deasetilasi ditentukan dari spektrum serapan spektrofotometer IR dengan metode garis dasar. Puncak tertinggi dicatat dan diukur dari garis dasar yang dipilih. Nilai absorbansi dihitung dengan rumus :

$$A = \log P_0/P$$

Keterangan;
$P_0$= % transmitansi pada garis dasar
P=% transmitansi pada puncak minimum

Perbandingan antara absorbansi pada $\tilde{V}$= 1655 cm-1 (serapan pita amina) dengan absorbansi $\tilde{V}$= 3450 cm$^{-1}$ (serapan pita hidroksi) dihitung untuk

N-deasetilasi kitin yang sempurna (100%) diperoleh $A_{1655}$= 1,33. Penggunaan nilai absorbansi puncak yangV terkait derajat deasetilasi dapat dihitung dengan cara : N-deasetilasi = 1- ($A_{1655}/A_{3450}$ x 1/1,33) x 100% (Bastaman, 1989, dalam Haryanto, 1955).

**3. Hasil dan Pembahasan**

**3.1 Pembuatan Kitin**

Penelitian utama dilakukan untuk mengekstraksi kitin dari cangkang udang melalui proses deproteinasi menggunakan NaOH dengan pemanasan tinggi. Deproteinasi bertujuan untuk memutuskan ikatan antara protein dan kitin, dengan cara menambahkan NaOH. Selama perendaman, protein terekstrak dalam bentuk Na-asam lemak ( Na-proteinat) akibat reaksi saponifikasi antara lemak yang terkandung dalam cangkang udang dengan larutan NaOH panas, dimana ion $Na^+$ akan mengikat ujung rantai protein yang bermuatan negatif dan mengendap (Suhartono,2000). Deproteinasi dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan NaOH 3 M dalam waktu 60 menit dan suhu ± $90^0$C.

Setelah dilakukan tahap deproteinasi, endapan yang diperoleh dicuci dengan akuades sampai pH netral, sebagai indikator digunakan pH universal. Pencucian ini dimaksudkan untuk mencegah terjadinya degradasi produk selama proses pengeringan.

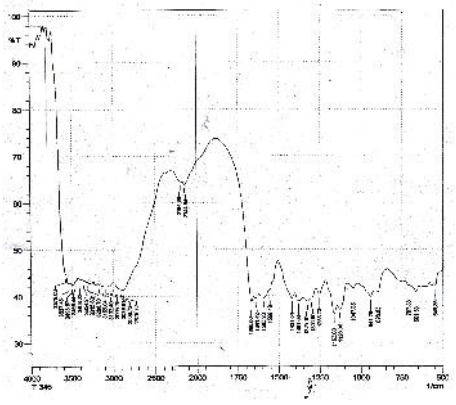
Pada tahap demineralisasi, senyawa kalsium akan bereaksi dengan asam klorida yang larut dalam air (Bastaman, 1989) Protein, lemak, fosfor, magnesium, dan besi turut terbuang dalam proses ini. Dalam penelitian ini, demineralisasi dilakukan pada temperatur 25-30$^0$C dengan larutan asam klorida 2 M dengan perbandingan (1:7).

Kitosan dihasilkan melalui tahap deasetilasi. Deasetilasi bertujuan untuk memutuskan gugus asetil ($-COCH_3$) yang terdapat pada kitin. Pada penelitian ini, deasetilasi kitin dilakukan dengan merendam kitin selama 60 menit pada suhu $90^0$C menggunakan larutan NaOH 20%. Menurut Muzzarelli (1986) kitin mempunyai struktur kristalin yang panjang dengan ikatan kuat antara atom nitrogen dan gugus karboksil. Oleh karena itu pada proses deasetilasi digunakan larutan NaOH dengan konsentrasi tinggi (40-60%) untuk mendapatkan kitosan dari kitin.

Berdasarkan hal di atas, deasetilasi kitin menggunakan metode kimia dengan perlakuan suhu 90-100 $^0$C selama 60 menit diperoleh derajat deasetilasi sebesar 71%.

**3.2 Penafsiran Spektrum IR kitosan**

Gambar 1 menunjukkan hasil identifikasi kitosan menggunakan metode kimia murni dengan pengukuran spektrofotometer FTIR Varian 2000. Hasil identifikasi gugus fungsi terlihat adanya serapan pada bilangan gelombang 3452, 49 cm-1 yang merupakan serapan dari gugus -OH. Gugus –OH digunakan sebagai standar internal dalam kitosan (Mario *et., al* 2008) sedangkan serapan khas kitosan terlihat pada bilangan gelombang 1666, 50 $cm^{-1}$ yang merupakan geseran tekuk N-H yang menunjukkan keberadaan amina primer ($NH_2$). Berikut adalah spektrum IR dari kitosan menggunakan metode kimia murni.

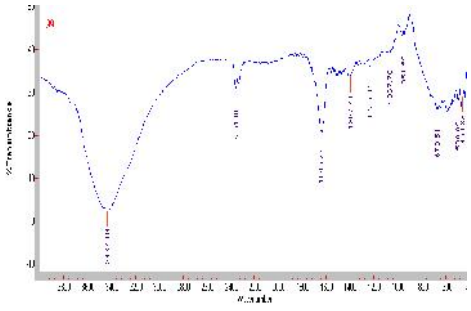


*Gambar 1. Spektra FTIR kitosan hasil deasetilasi metode kimia hasil*

*pengukuran FTIR Varian 2000*

### 3.3 Deasetilasi Enzimatis

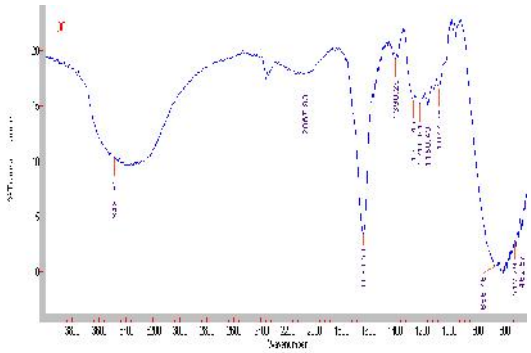
Proses deasetilasi enzimatis dapat meningkatkan derajat deasetilasi 5-30%, tergantung pada derajat deasetilasi awal. Semakin tinggi derajat deasetilasi awal, semakin kecil peningkatan derajat deasetilasi yang terjadi. Sebelumnya kitin dalam bentuk tepung direndam dalam NaOH 60% selama 24 jam, kemudian di panaskan pada suhu $60^0$C selama 2 jam. Penepungan dilakukan agar proses deasetilasi dapat berlangsung lebih cepat dan sempurna, karena semakin luasnya permukaan yang dapat diakses oleh larutan alkali (No dan Meyers, 1997). Hasil pengukuran derajat deasetilasi kitosan kimiawi dengan spektrofotometer IR disajikan pada gambar 2.



*Gambar 2. Spektra IR kitosan hasil deasetilasi kimia sebagian hasil pengukuran spektrofotometer FTIR (-8010PC)*

Derajat deasetilasi awal yang rendah menunjukkan banyaknya jumlah residu asetil yang belum terpotong. Lebih banyak residu asetil menunjukkan lebih banyak substrat yang tersedia untuk reaksi enzim. Sesuai dengan kinetika enzim, semakin banyak substrat yang tersedia, laju reaksi akan semakin cepat dan akan menurun jika jumlah substrat berkurang (Suhartono 1989).

Kitin hasil deasetilasi sebagian dilarutkan dalam asam asetat 0,1 M. Kemudian dicampurkan enzim CDA (Kitin Deasetilase) 100 µL dalam 10 ml larutan kitosan 1% lalu di inkubasi pada suhu 55 $^0$C selama 24 jam. Hasil pengukuran derajat deasetilasi kitosan enzimatis dengan spektrofotometer IR disajikan pada gambar 3.



*Gambar 3. Spektra IR kitosan hasil deasetilasi enzimatis hasil Pengukuran spektrofotometer FTIR (-8010PC)*

### 3.4 Kadar Air

Berdasarkan hasil penelitian telah diketahui bahwa kadar air kitosan sebesar 7,59%. Hal ini menunjukkan bahwa kitosan yang dihasilkan memenuhi standar mutu kadar abu yang ditetapkan Spesifikasi Kitosan Niaga (Anonim, 1987) yakni sebesar < 10%. Kadar air tidak dipengaruhi oleh konsentrasi NaOH serta suhu deasetilasi yang digunakan. Hal ini disebabkan kadar air yang terkandung pada kitosan dipengaruhi oleh proses pengeringan, lama pengeringan yang dilakukan, jumlah kitosan yang dikeringkan dan luas permukaan tempat kitosan dikeringkan (Saleh *et al*., 1994).

### 3.5 Kadar Abu

Hal ini menunjukkan bahwa kadar abu kitosan belum memenuhi standar yang ditetapkan Spesifikasi Kitosan Niaga (Anonim, 1987) yakni < 2%. sebagian besar cangkang udang mengandung mineral kalsium karbonat dan kalsium fosfat. Penghilangan mineral dipengaruhi oleh proses pengadukan selama demineralisasi,

sehingga panas yang dihasilkan menjadi homogen. Proses pengadukan yang konstan akan menyebabkan panas merata sehingga pelarut asam klorida (HCl) dapat mengikat mineral secara sempurna. Jika pengadukan yang dilakukan tidak konstan maka panas yang dihasilkan tidak merata, sehingga reaksi pengikatan mineral oleh pelarut juga akan tidam sempurna (Hartati FK et al., 2002). Selain itu proses pencucian yang baik hingga diperoleh pH netral juga berpengaruh terhadap kadar abu. Mineral yang terlepas dari sampel akan berikatan dengan pelarut dapat terbuang dan larut bersama air (Angka dan Suhartono, 2000).

## 4. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa karakteristik kitosan yang meliputi kadar air, kadar abu, dan derajat deasetilasi masing-masing adalah 7,39%, 2,10%, dan derajat deasetilasi kimia murni sebesar 71%. Berdasarkan pengamatan spektrofotometer IR menunjukkan adanya kitosan hasil deasetilasi sebagian yang terdeteksi pada daerah serapan amina primer dengan bilangan gelombang 1645,77 $cm^{-1}$, dan setelah penambahan enzim CDA menghasilkan kitosan yang terdeteksi pada daerah serapan 1636,50 $cm^{-1}$.

## 5. Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih atas dukungan dana penelitian dari Program Kegiatan Insentif PKPP 2011 Kementrian Riset dan Teknologi melalui penelitian pembuatan kitosan dan nano partikel kitosan dengan tripoli fosfat dari limbah cangkang udang (crustaceae) dan aplikasinya sebagai bahan memperpanjang *shelf-life* produk buah segar dan buah kaleng dengan No. Kontrak 12/SPK/RISTEK/BPKIMI/03/2011 tanggal 3 Maret 2011.

## 6. Daftar Pustaka

Angka, S.L. dan M.T. Suhartono, 2000. Pemanfaatan Limbah Hasil Laut. IPB.Bogor

AOAC. 1999. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 5th Revision. Volume 2. Cunnif P(Editor). Maryland : AOAC International.

Bastaman S. 1989. *Studies On Degradation and Extraction of Chitin and Chitosan From Prawn Shells.* Belfast: The Departement Of Mechanical Manufacturing , Aeronautical and Chemical Engineering. The Queen's University

Hartati FK, Susanto.T, Rakhmadiono S, Adi Loekito S. 2002. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap tahap deproteinasi Menggunakan Enzim Protease dalam Pembuatan Kitin dan Kitosan dari cangkang Rajungan (*Portunus Pelagius).* Jurnal Biosain. Vol 2:1

Hirano, S. 1986. Chitin and Chitosan. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. *Republicka of Germany*. $5^{th}$ . ed. A 6: 231 – 232.

Kafetzhopoulos D, Martinou A, Bouriotis V. 1993. Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor Rouxii*. *Proc Natl Acad Scii* USA 90:2564-2568.

Mario, F. D., P. Rapan'a, U. Tomati, E. Galli.2008. Chitin and Chitosan from Basidomycetes. *Intern*. *Journal of Biological Macromolecules,* 4:8-12

Muzzarelly.1986. *Studies on The Suitable of Chitinocistic Microorganism for Shrimp*

*Waste Fermentation*. Dissertation. University of Washington. New York.

No, H.K., S.P. Meyers, K.S. Lee, 1989. Isolation abd Characterization of chitin frow Crawfish Shell Waste, *J. Agri. Food Chem*., 37:575-579

Saleh MR, Abdillah, Suerman E, Basmal J, Indriati N.1994. Pengaruh Suhu, waktu dan konsentrasi pelarut pada Ekstraksi Kitosan dari Limbah Pengolahan Udang Beku Terhadap Beberapa Parameter Mutu Kitosan. Jurnal Pasca Panen Perikanan 81:30-43

Tsigos I, Bouriotis V. 1995. Purification and Characterization of Chitin Deacetylase from *Colletotrichum Lindemuthianum*. *The Journal Of Biological Chemistry* 270: 26286-26291.

Tsigos, I., A. Martinou, Kafetzopoulos and V. Bouriotis. 2000. Chitin deacetylases: New versatile tools in biotechnology. *TIBTECH Rev,* 18: 305-312.

Tokuyasu K, Ono H, Kameyama MO, Hayashi K, Moil Y. 1997. Deacetylation of Chitin Oligosaccharides of dp 2-4 by Chitin Deascetylase from *Colletotrichum Lindemuthianum. Carbohydrate Research* 303:353-358.